

УДК 632.932:579.23

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА С РАЗНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ****Э.В. Попова<sup>1</sup>, Н.С. Домнина<sup>2</sup>, Н.М. Коваленко<sup>1</sup>, Е.А. Борисова<sup>3</sup>,  
Л.Е. Колесников<sup>3</sup>, С.Л. Тютюрев<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург;<sup>2</sup>Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург;<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Санкт-Петербург;

Для природного полисахарида хитозана характерна структурная неоднородность, что влияет на его биоцидные и иммуномодулирующие свойства. В работе проведена сравнительная оценка бактерицидной, антигрибной и индуцирующей активности хитозана с разной молекулярной массой (ММ) от 3 до 150 кДа и постоянной степенью деацетилирования (85%). Образцы хитозана с ММ от 5 до 50 кДа показали более высокую антибактериальную активность против грамотрицательных (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*) и грамположительной (*Bacillus polymyxa*) бактерий по сравнению с образцами с низкой (3 кДа) и высокой (150 кДа) ММ. Все хитозановые образцы в течение 10 суток культивирования сдерживают рост мицелия гриба *F. oxysporum* на 44.4–80.0%, а мицелий гриба *S. sclerotiorum* на 60.6–86.3% по сравнению с контролем. Уменьшение ММ полимера до 3 кДа снижало ингибирующее действие хитозана на рост гриба *F. oxysporum*. Полученные результаты подтверждают положение о зависимости биоцидной активности хитозана от ММ. Установлено, что образцы хитозана с ММ от 6.5 до 150 кДа обладают иммуностимулирующими свойствами и повышают устойчивость растений пшеницы к бурой ржавчине, что выразилось в ингибировании развития выживших пустиль на листьях от 79.5 до 89.0%.

**Ключевые слова:** хитозан, молекулярная масса, антибактериальная активность, антигрибная активность, индуцированная устойчивость.

Широко распространенный в природе аминополисахарид хитозан привлекает внимание исследователей благодаря уникальным физико-химическим свойствам, разнообразной биологической активности (биоцидной, элиситорной) и полной безопасности для окружающей среды (биосовместимость, биodeградируемость) [Тютюрев, 2014; El Hardrami et al. 2010].

Хитозан представляет собой полимер, в котором имеются звенья глюкозамина и ацетилглюкозамина. При этом в виду специфичности получения хитозана из разнообразных природных источников для него характерна структурная неоднородность по многим параметрам [Хитин и хитозан, 2002]. Результаты, полученные разными авторами, свидетельствуют о том, что биоцидная (антибактериальная, антигрибная) и элиситорная активности хитозана определяются его структурными и молекулярными параметрами. К ним следует отнести молекулярную массу (ММ), количественное соотношение ацетилированных и деацетилированных звеньев, а также характер их расположения вдоль полимерной цепи. Именно эти особенности хитозана обуславливают многообразие его биологических свойств [Куликов и др., 2013].

Несмотря на то, что изучению биоцидной активности хитозана посвящено множество работ, механизмы антибактериального и антигрибного действия этого биополимера на клеточном и на молекулярном уровне раскрыты не полностью. Большинство исследований свидетельствуют о том, что причиной биоцидной активности хитозана является поликатионная природа и его способность связываться с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеток [Куликов и др., 2013]. Такое взаимодействие нарушает нормальное функционирование обменных процессов клетки с внешней средой, изменяет проницаемость цитоплазматической мембраны, в результате чего усиливается отток веществ из клетки. Таким образом, для достижения максимальной антимикробной активности хитозану необходимо иметь максимальное количество свободных аминогрупп.

Первой мишенью действия хитозанового полимера в случае грамотрицательных бактерий становится липополисахарид, который заряжен отрицательно и входит в состав внешней мембраны. У грамположительных бактерий главной мишенью для хитозана могут быть тейхоевые кислоты, отрицательный заряд которым придают многочисленные остатки фосфорной кислоты.

Некоторые авторы выявили различия в чувствительности к хитозану грамотрицательных и грамположительных бактерий, тогда как в ряде работ показано, что различия в типе клеточной стенки обеих бактерий не является определяющим [Kong et al., 2010].

В работе Ильиной А.В. [Ильина и др., 2003] проведено исследование антибактериальной активности хитозана от двух параметров – от молекулярной массы и степени деацетилирования (СД). Оценка биологической активности хитозанов в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов показала, что для полимеров с ММ 5–27 кДа разница действия на оба типа бактерий практически отсутствует. При тестировании хитозанов с одной ММ (4 кДа) и с изменяющейся СД (55, 73, 78 и 86%) установлена тенденция к увеличению уровня гибели клеток по мере роста СД полимера. По мнению авторов, высокая концентрация положительных зарядов на макроцепи хитозана с максимальной СД приводит к образованию наиболее прочной связи с поверхностью клеточной стенки микроорганизмов.

В литературе, однако, нет однозначной корреляции между значением ММ хитозана и его биологическими свойствами [Тютюрев, 2014; El Hardrami A. et al., 2010]. В работе [Fernandes et al, 2009] показано, что с возрастанием ММ хитозана в отношении вегетативных клеток *Bacillus cereus* антимикробный эффект усиливался в ряду от олигосахаридов до образцов с ММ 628 кДа. Биоцидное действие высокомолекулярного хитозана объясняется тем, что увеличение количества аминогрупп способствует более прочному связыванию полимера с поверхностными структурами клетки, что может уменьшить скорость

диффузии питательных веществ, в которых нуждается микробная клетка.

В работе [Kumar et al., 2007] описывается противоположный эффект, а именно, более высокой антибактериальной активностью обладают низкомолекулярные образцы хитозана. Бицидное действие низкомолекулярного хитозана авторы работы связывают с тем, что он обладает большей проникающей способностью через клеточную стенку бактерий, нарушает их функционирование, влияя на физиологические внутриклеточные процессы, что приводит клетку к гибели.

К настоящему времени установлено, что хитозан имеет прямое фунгистатическое действие, которое зависит от его физико-химических свойств (молекулярной массы и степени деацетилирования), а также вида микроорганизма. К хитозану более чувствительны грибы и оомицеты, содержащие незначительное количество хитозана в клеточных стенках, а зигомицеты, содержащие большое количество хитозана в клеточных стенках, устойчивы к его воздействию. Энтомопатогенные грибы, обладающие высокой хитинолитической активностью, устойчивы к действию хитозана [Тютюрев, 2014].

Результаты исследования процесса ингибирования хитозаном с различной молекулярной массой девяти растительных патогенных грибов *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*, *Colletotrichum capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Curvularia lunata*, *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae*, and *Sphaceloma ampelinum* показали, что полимеры с низкой ММ обладают более высокой степенью ингибирования мицелия, чем высокомолекулярные хитозаны [Narong Singburadom et al., 2011]. В другой работе, наоборот, установлено, что с увеличением молекулярной массы антигрибная активность против *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata* растет [Seyfarth et al, 2008].

Механизм антигрибного действия хитозана по аналогии с бактериями связывают с нарушением структуры клеточной стенки, ведущее к изменению морфологии мицелия, размера спор и нарушению целостности грибной цитоплазматической мембраны, приводящее к выходу из клеток цитоплазматического содержимого. Электростатическое взаимодействие положительно заряженных свободных аминогрупп хитозана с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран клеток грибов подтверждается его рН-зависимостью, различной для низко- и высокоацетилированного хитозана с одинаковой молекулярной массой и концентрацией в среде [Тютюрев, 2014]. В связи с этим хитозаны с большой степенью деацетилирования (86–90%) во всех случаях проявляли более сильное фунгистатическое действие, чем хитозаны с СД ниже 80%. Этот параметр играет решающую роль в адгезии хитозана к клеткам мицелия и спор грибов.

Биологическая активность хитозана как индуктора устойчивости определяется его способностью индуцировать защитные реакции и устойчивость растений к болезням.

Известно, что хитин и хитозан являются молекулярными детерминантами фитопатогенных грибов, узнаваемых белковыми рецепторами растений. Взаимодействие с рецепторами индуцирует в растениях базовую устойчивость. Хитозан индуцирует в растениях изменения клеточных

мембран, хроматина, ДНК, МАР-киназ, окислительный взрыв (образование АФК), отложение каллозы, РР-белков и фитоалексинов [Тютюрев, 2014].

В отличие от биоцидной активности для элиситорной активности в растениях важную роль играют именно ацетилированные звенья хитозана, которые отвечают за связь хитозанового полимера со специфическими растительными рецепторами. Поэтому в ряде случаев уменьшение ацетилированных звеньев ниже определенной доли в составе хитозана влечет частичную или полную потерю его элиситорных способностей [Тютюрев, 2014].

Элиситорная активность хитозана в растениях, безусловно, зависит также от степени полимеризации молекул хитозана. Так, низкомолекулярный хитозан был наиболее эффективен при подавлении вируса мягкой мозаики фасоли в растениях фасоли [Куликов и др., 2006]. В работе [Васюкова и др., 2001] показано, что хитозаны с молекулярной массой 5, 24 и 200 кДа индуцировали в клубнях картофеля глюканазную и хитиназную активности, образование ингибиторов протеаз и фитоалексина, однако, максимальный эффект достигался при использовании самого низкомолекулярного образца, в то время как хитозан с ММ 200 кДа был наименее активен.

Однако на некоторых растениях элиситорная активность хитозана увеличивалась с ростом его молекулярной массы. Было предположено, что высокомолекулярные молекулы хитозана, длительное время находясь на поверхности листьев растений, постепенно расщепляются выделяемыми растениями ферментами до более мелких фрагментов, которые, обладая большей проникающей способностью, обеспечивают длительный элиситорный эффект. Обработка хитозаном (ММ 120 кДа) за сутки до заражения приводила к более высокой устойчивости картофеля к вирусу, чем при использовании хитозанов с молекулярной массой 3 и 36 кДа. Таким образом, доля растений с индуцированной устойчивостью прямо зависела от молекулярной массы хитозана, использованного для их обработки. [Чирков и др., 2001].

Оценка эффективности хитозанов с разной молекулярной массой (6–753 кД) в повышении устойчивости фасоли к вирусу некроза табака помогла установить положительную корреляцию между иммунологической активностью хитозана и его способностью индуцировать синтез каллозы [Faoro et al., 2007]. Авторами показано, что хитозаны с ММ 76, 120 и 139 кДа были наиболее эффективными в индуцировании синтеза каллозы по сравнению с теми, у которых более низкая или более высокая ММ. Самым эффективным оказался хитозан с ММ 76 кДа, снижающий до 95% вирусные поражения. Хитозаны с ММ более 300 кДа были менее эффективны, причем снижение пораженности растений вирусом составляло 70–50%.

Противоречивые данные в оценке влияния молекулярной массы хитозанового полимера на его биоцидную и иммунизирующую активности, незначительное число работ, касающихся влияния химической структуры хитозана на возбудителей болезней сельскохозяйственных растений свидетельствует о необходимости продолжения исследований и их актуальности.

Можно считать установленным, что любая биологическая активность хитозана в первую очередь определяется наличием положительного заряда на его макромолекулах.

Для установления однозначного влияния структуры хитозана на его биологическую активность исследуемые образцы полимера должны, как правило, иметь одинаковую степень деацетилирования. Основываясь на собственных [Тютюрев, 2014] и литературных данных, можно констатировать, что наибольшую биологическую активность про-

являет хитозан со степенью деацетилирования молекулы от 70% до 90%.

Цель работы состояла в сравнительном изучении антибактериальной, антигрибной и индуцирующей активности хитозана с разной молекулярной массой и постоянной степенью деацетилирования 85%.

### Материал и методы

Для опытов использовали хитозан с ММ 150 кДа с СД=85% (производство «Биопрогресс»). Путем окислительной деструкции из этого хитозана были получены образцы с различными ММ (3, 5, 6.5, 10, 50, 100 кДа) при сохранении СД=85% [Погореленко, 2003].

Антибактериальная активность образцов хитозана оценивалась по их способности подавлять рост культур бактерий, вызывающих вредоносные заболевания сельскохозяйственных культур:

*Bacillus polymyxa* (Prazmowski 1880) Mace 1989 – бактериальная гниль клубней картофеля;

*Pseudomonas syringae* – пятнистость томата и других овощных культур;

*Erwinia carotovora* – черная ножка картофеля, бактериозы капусты, мягкая гниль тыквы, моркови, редиса, томата и др.

Тест-культуры получены из коллекций типовых культур ВНИИСХМ и лаборатории микробиометода ВИЗР. Оценка биоцидной активности заявленного соединения проводили в соответствии с Методическими указаниями по... [1985].

В основу положен метод диффузии испытуемого соединения в питательную среду. Метод основан на сравнении ингибирования роста тест-микроорганизма испытуемым раствором по отношению к контролю (дистиллированная вода) и определении биологической активности исследуемого соединения по зоне ингибирования роста тест-микроорганизма (радиус зоны ингибирования роста тест-организма в мм).

#### Ход анализа.

В стерильные чашки Петри разливают охлажденную до 45°C картофельно-глюкозный агар. После застывания среды

на поверхность агара наносят 0.2 мл суспензии из бактериальных спор тест-культуры ( $10^6$  в 1 мл). После инокуляции агара тест-микроорганизмами чашки оставляют на 1–2 часа для впитывания инокулюма. Затем на поверхности агара стерильным сверлом делают лунки диаметром 6 мм. В лунки каждой чашки одновременно вносят по 0.2 мл раствора испытуемого препарата в концентрации 0.2% и раствора стандарта. После этого чашки оставляют в течение 1–2 часов при комнатной температуре, а затем помещают в термостат и выдерживают при 25°C в течение 48 часов. Для каждого рабочего раствора измеряют зоны ингибирования роста тест-микроорганизмов в мм (радиус).

Изучение бактерицидной активности препаратов проводили методом агаровых блоков [Билай, 1982]. В качестве тест грибов использовали следующие возбудители болезней: гриб *Fusarium oxysporum*, вызывающий фузариозное увядание томата, и гриб *Sclerotinia sclerotiorum*, вызывающий белую гниль томата.

Эффективность хитозановых образцов против бурой ржавчины пшеницы (*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz f. sp. *tritici*) проводили на восприимчивом к бурой ржавчине сорте пшеницы Саратовская 29 в модельной системе. Хитозановыми образцами (0.1%) опрыскивали «газоны» из 7-дневных проростков пшеницы из расчета 10 мл на газон. В контроле газоны обрабатывали водой. Через 24 часа такие газоны заражали бурой ржавчиной (*P. recondita*), путем опрыскивания 0.5 мл суспензии спор на газон. Инфекционная нагрузка составила  $10^5$  спор в 1 мл воды. Через 7 дней подсчитывали на листьях газона количество выживших пустил патогена.

### Результаты и их обсуждение

С учетом известного механизма действия хитозанов на микроорганизмы [Куликов, 2013] в опыт были взяты грамотрицательные (*P. syringae*, *E. carotovora*) и грамположительная (*B. polymyxa*) бактерии. Большинство исследователей при изучении антибактериальной активности хитозана в качестве растворителя используют 0.2% соляную или уксусную кислоты, которые сами по себе обладают антимикробной активностью, что может влиять на истинные показатели антимикробного действия исследуемых соединений. В наших экспериментах для растворения образцов хитозана была использована янтарная кислота – природная органическая кислота, не обладающая антимикробными свойствами и широко применяемая в сельском хозяйстве для повышения урожайности.

Проведенные эксперименты по оценке прямой бактерицидной активности показали, что все использованные образцы хитозана с ММ от 3–150 кДа обладают активностью по отношению к обоим типам бактерий (табл. 1).

Выявлена общая закономерность в действии хитозанов на все тест-объекты. Хитозаны с ММ от 5 до 50 кДа обладают достаточно большой антибактериальной активностью. Уменьшение ММ полимера до 3 кДа снижало ингибирующее действие хитозана на рост бактерий. Значительно меньшей бактерицидной активностью обладает хитозан с ММ 150 кДа. Наибольшей чувствительностью

к хитозановым полимерам обладает грамотрицательная бактерия *E. carotovora*. Другая грамотрицательная бактерия *P. syringae*, наоборот, оказалась самой устойчивой к действию поликатиона. Это свидетельствует о том, что различия в типе клеточной стенки у грамотрицательных и грамположительных бактерий не является определяющим в чувствительности клеток к поликатиону

Таблица 1. Антибактериальная активность образцов хитозана с разной молекулярной массой

ММ образцов хитозана, кДа	Зона ингибирования роста бактерий (тест-объекта), R мм		
	граммотрицательные		грамположительные <i>B. polymyxa</i>
	<i>P. syringae</i>	<i>E. carotovora</i>	
3	0.75 ± 0.03	1.0 ± 0.05	0.75 ± 0.05
5	0.80 ± 0.02	2.1 ± 0.10	1.4 ± 0.05
10	1.0 ± 0.05	2.0 ± 0.10	1.7 ± 0.10
50	1.5 ± 0.05	2.2 ± 0.15	1.7 ± 0.10
150	0.05 ± 0.02	1.0 ± 0.05	0.70 ± 0.03

По чувствительности к хитозану бактерии можно ранжировать следующим образом:

*E. carotovora* > *B. polymyxa* > *P. syringae*. Полученные данные согласуются с литературными, что эффективное свя-

зывание хитозана с мембранными структурами бактерий определяется особенностями строения их клеточных стенок, то есть существуют видовые различия в чувствительности микроорганизмов к хитозановому полимеру.

Таким образом, видно, что антимикробные свойства хитозанов с одинаковой степенью деацетилирования, обусловленные уникальной способностью взаимодействовать с клеточной стенкой микроорганизмов, зависят от молекулярной массы хитозанов.

Все хитозановые образцы обладают фунгистатической активностью, сдерживая рост мицелия гриба *F. oxysporum* на 44.4–80.0%, а мицелий гриба *S. sclerotiorum* на 60.6–86.3% в течение 10 суток культивирования по сравнению с контролем. Эффект ингибирования роста колонии грибов зависел от ММ хитозана. Низкомолекулярный образец (3 кДа) эффективно сдерживал рост мицелия гриба *S. sclerotiorum* до 80%, но менее эффективно подавлял мицелиарный рост аскомицета *F. oxysporum*, ингибируя рост мицелия всего на 44% по сравнению с контролем. Напротив, высокомолекулярный хитозан (150 кДа) сильнее подавлял радиальный рост мицелия *F. oxysporum* по сравнению с *S. sclerotiorum*. Хитозаны с молекулярной массой от 5 до 50 кДа одинаково эффективно ингибировали рост колоний обоих грибов в течение 10 суток культивирования (табл. 2).

Таблица 2. Антигрибная активность образцов хитозана с разной молекулярной массой (*in vitro*)

ММ образцов хитозана, кДа	Ингибирование роста мицелия грибов при культивировании, % к контролю			
	<i>F. oxysporum</i>		<i>S. sclerotiorum</i>	
	5-е сутки	10-е сутки	5-е сутки	10-е сутки
3	61.1	44.4	77.7	75.0
5	79.6	78.0	84.4	86.3
10	83.1	77.0	86.4	85.0
50	82.3	80.0	82.2	76.0
150	79.1	72.2	66.0	60.6

Таким образом, антигрибная активность хитозана при оптимальной степени деацетилирования (85%) определяется его молекулярной массой, а также видом патогена.

Известно, что при действии хитозана на растения, в них происходит координированная индукция целого комплекса защитных реакций, приводящая к повышению устойчивости растений к последующему заражению патогеном. При этом интенсивность индукции может зависеть от молекулярной массы хитозана [Faoro, Iriti, 2007]. Но кроме сигнала для включения защитных реакций растени-

ем молекулы хитозана, находясь на поверхности листьев, создают также физический барьер для проникновения патогена, что сдерживает его распространение.

Данные по оценке индуцирующей активности хитозанов с разной молекулярной массой в повышении устойчивости пшеницы к бурой ржавчине представлены в табл.3. Установлено, что обработка растений исследуемыми образцами эффективно защищает пшеницу от бурой ржавчины, что выражается в значительном снижении пораженности листьев пшеницы (до 15–20%) по сравнению с контролем (100%). Все образцы подавляют развитие пустул на листьях от 79.5 до 89.0% и повышают устойчивость растений пшеницы к бурой ржавчине. Некоторое снижение эффективности в ингибировании развития пустул (79.5%) отмечено для хитозана с ММ 150 кДа.

Таблица 3. Влияние образцов хитозана в концентрации 0.1% на устойчивость пшеницы к бурой ржавчине

Вариант опыта	ММ хитозана, кДа	Поражение листьев бурой ржавчиной, % от контроля, НСР <sub>0.05</sub> =9.0	Подавление развития пустул бурой ржавчины, % от контроля
Контроль заражение	—	100	—
Хитозан	6.5	15	89.0 ± 0.6
Хитозан	60	18	86.0 ± 0.5
Хитозан	100	15	89.1 ± 0.6
Хитозан	150	20	79.5 ± 0.4

После инокуляции развитие ржавчинного гриба начинается с попадания уредоспор на листья пшеницы, где они начинают прорастать. Так как хитозан является пленкообразующим полимером, то нанесенный на листья растений, он может задерживать процесс проникновения и развития уредоспор. Это подтверждают гистологические исследования, которые показали, что на поверхности плодов цитрусовых, обработанных хитозаном, наблюдается ограничение роста патогена и нарушение структуры его гиф.

Таким образом, независимо от механизмов, лежащих в основе индуцированной устойчивости, структурные параметры хитозана, такие как молекулярная масса и степень деацетилирования, определяют его способность к повышению устойчивости растений к последующему заражению патогеном. Выбор хитозана, оптимального по структуре и являющимся биологически активным по отношению к конкретным патосистемам растение – патоген, имеет фундаментальное значение.

### Заключение

Проведена сравнительная оценка бактерицидной, фунгистатической и индуцирующей активности хитозана с разной молекулярной массой (3–150 кДа) и постоянной степенью деацетилирования (85%). Полученные результаты подтверждают положение о зависимости биоцидной и индуцирующей активности хитозана от ММ. Все образцы хитозана от 5 до 50 кДа обладают антибактериальной активностью против грамотрицательных (*P. syringae*, *E. carotovora*) и грамположительной (*B. polymyxa*) бактерии. Уменьшение Мм полимера до 3кДа и повышение до 150 кДа

снижает ингибирующее действие хитозана на рост бактерий. Наибольшей чувствительностью к хитозановым полимерам обладает грамотрицательная бактерия *E. carotovora*. Все хитозановые образцы характеризуются фунгистатической активностью. Они сдерживают рост мицелия гриба *F. oxysporum* на 44.4–80.0%, а мицелия гриба *S. sclerotiorum* на 60.6–86.3% в течение 10 суток культивирования по сравнению с контролем. При этом низкомолекулярный образец (3 кДа) эффективно сдерживал рост мицелия гриба *S. sclerotiorum* до 80% на 10-е сутки, но менее эффективно подавлял мицелиарный рост

аскомицета *F. oxysporum*, ингибируя рост мицелия на 44% по сравнению с контролем. Напротив, высокомолекулярный хитозан (150 кДа) сильнее подавлял радиальный рост мицелия *F. oxysporum* по сравнению с *S.sclerotiorum*. Таким образом, при оптимальной степени деацетилирования

(85%) антигрибная активность хитозана зависит от его ММ и вида патогена. Установлено, что хитозановые образцы с ММ от 6.5 до 150 кДа обладают высокой индуцирующей активностью и повышают устойчивость растений пшеницы к бурой ржавчине, что выразилось в подавлении развития пустил на листьях от 79.5 до 89.0%.

#### Библиографический список (References)

- Билай В.И. Методы экспериментальной микологии // Наукова думка. 1982. 275 с.
- Васюкова Н.И. Модулирование болезнестойчивости растений с помощью водорастворимого хитозана / Васюкова Н.И., Зиновьева С.В., Ильинская Л.И., Переход Е. А., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Ильина А.В., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. N 1. С. 115–122.
- Ильина А.В. Влияние степени ацетилирования на ферментативный гидролиз хитозана препаратом целловириндин G20x./Ильина А.В., Варламов В.П.// Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. N 3. С. 273–277.
- Куликов С.Н. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях / Куликов С. Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. N 2. С. 224–228.
- Куликов С.Н. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизм действия и роль структуры./Куликов С.Н., Хайрулин Р.З. //Хитозан. М.: «Центр Биоинженерия» РАН. 2013. С. 363–407.
- Методические указания по государственному испытанию фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян сельскохозяйственных культур.// М.: 1985. 130 с.
- Погореленко А.Б. Конъюгаты хитозана и альдегидпроизводных фенолов./ Погореленко А.Б., Домнина Н.С., Попова Э.В., Тютюрев С.Л. // Вестник СПбГУ, 2003. сер. 4. вып. 3. С.
- Тютюрев С.Л. Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням.// СПб.: 2014. 212 с.
- Хитин и хитозан: получение, свойства и применение. / Под ред. Скрыбина К.Г., Вихорева Г.А., Варламова В.П. // М.: Наука. 2002. 368 с.
- Чирков С.Н. Влияние хитозана на системную вирусную инфекцию и некоторые защитные реакции в растениях картофеля./Ильина А.В., Сургучева Н.А., Летунова Е.В., Варицев Ю.А., Татарнинова Н.Ю., Варламов В.П. // Физиология растений 2001. Т. 48. вып. 6. С. 890–896.
- Benhamou N. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan.// Phytopathology 2004. V. 94. P. 693–705.
- Chen Y.M. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen./ Chen Y.M., Chung Y.C., Wang L.W., Chen K.T., Li S.Y.//J. Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2002.V. 37. N. 7, P. 1379–1390.
- El Hadrami A. Chitosan in Plant Protection / El Hadrami A, Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F.// Marine Drugs. 2010. V. 8. N.4. P. 968–987.
- Fernandes J.C. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation./ Fernandes J.C., Eaton P., Gomes A.M., Pimtdo M.E., Xavier Malcata F.// Ultramicroscopy 2009. V. 109. N. 8. P. 854–860.
- Franco F. Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens/ Franco F., Iriti M. // Caryologia 2007. V. 60. N. 1–2. P. 121–124.
- Kong M. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review./ Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J.// Int. J. Food Microbiology 2010. V. 144. P. 51–63.
- Kumar A.B.V. Low molecular weight preparation with the aid of pepsin, characterization, and bactericidal activity./Kumar A.B.V., Varadaraj M.C., Tharanathan R.N. // Biomacromolecules. 2007. V. 2. N. 2. P. 566–572.
- Seyfarth F. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*./ Seyfarth F., Schliemann S., Elsner P., Hipler U.C. //Int. J. Pharm. 2008. V. 353. N.1–2. P. 139–148.
- Singburadom N. Antimicrobial Activity of Different Molecular Weight Chitosans to Inhibit Some Important Plant Pathogenic Fungi./ Narong Singburadom N., Piasai O., Dethaib T. //Kasetsart J. (Nat. Sci.) 2011. V. 45. P. 644–655.

#### Translation of Russian References

- Bilay V.I. Methods of experimental mycology. Kiev: Naukova Dumka. 1982. 275 p. (In Russian).
- Chirkov S.N., Ilyina V.A., Surgucheva, N.A. Leonova E.V., Varitsev Yu.A., Tatarinova N.Yu., Varlamov V.P. Effect of chitosan on systemic viral infection and some defense reaction in potato plants. *Fiziologiya rastenii*, 2001. Vol. 48. N 6. P. 890–896. (In Russian).
- Ilyina A.V., Varlamov V.P. Effect of degree of acetylation on the enzymatic hydrolysis of chitosan drug Celoviridin G20x. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2003. Vol. 39. N 3. P. 273–277. (In Russian).
- Kulikov S.N., Chirkov S.N., Ilyina A.V., Lopatin S.A., Varlamov V.P. Influence of molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2006. Vol. 42. N 2. P. 224–228. (In Russian).
- Kulikov S.N., Khairulin R.Z. Antibacterial and antimycotic activity of chitosan: mechanism of action and role of structure. Moscow: Tsentr Bioinzheneriya RAN, 2013. P. 363–407. (In Russian).
- Novozhilov K.V. (Ed.) Methodical instructions on the state testing fungicides, antibiotics and seed dressers on crops. Moscow, 1985. 130 p. (In Russian).
- Pogorelenko A.B., Domnina N.S., Popova E.V., Tyuterev S.L. Conjugates of chitosan and aldehyde derivative phenols. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta*. 2003. Ser. 4. Vol. 3. P. 97–104 (In Russian).
- Skryabin K.G., Vikhoreva G.A., Varlamov V.P. (Eds.). Chitin and chitosan: production, properties and application. Moscow: Nauka, 2002. 368 p. (In Russian).
- Tyuterev S.L. Natural and synthetic inducers of plant resistance to diseases. St. Petersburg, 2014. 212 p. (In Russian).
- Vasyukova N.I., Zinovieva S.V., Ilyinskaya L.I., Perekhod E.A., Chalenko G.I., Gerasimova N.G., Ilyina A.V., Varlamov V.P. Modulation of balneological plants using water-soluble chitosan. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2001. Vol. 37. N 1. P. 11–122. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 3(93), p. 28–33

### BIOLOGICAL ACTIVITY OF CHITOSAN WITH VARIOUS MOLECULAR WEIGHTS

E.V. Popova<sup>1</sup>, N.S. Domnina<sup>2</sup>, N.M. Kovalenko<sup>1</sup>, E.A. Borisova<sup>3</sup>, L.E. Kolesnikov<sup>3</sup>, S.L. Tyuterev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> St. Petersburg State Agrarian University, St. Petersburg, Russia

A comparative evaluation of the bactericidal, fungistatic and inducing activity of chitosan with various molecular weights (3 to 150 kDa) and a constant degree of deacetylation (85%) was carried out. Samples of chitosan with molecular mass (MM) 5 to 50 kDa showed higher antibacterial activity against gram-negative (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*) and gram-positive (*Bacillus polymyxa*) bacteria, than chitosan with 3 kDa and 150 kDa. All chitosan samples characterized by fungistatic activity, inhibiting mycelial growth of *Fusarium oxysporum* fungus by 44.4–80.0%, and mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus by 60.6–86.3% during 10 days of cultivation as compared to the control. The decrease of the polymer MM to 3 kDa

reduced the inhibitory effect of chitosan on the growth of the fungus *F. oxysporum*. The obtained results confirm the dependence of the chitosan biocidal activity on MM. It has been established that the chitosan samples with MM 6.5 to 150 kDa increase the resistance of wheat plants to brown rust, suppressing the development of surviving pustules on leaves by 79.5 to 89.0%.

**Keywords:** chitosan; molecular weight; antimicrobial activity; fungal activity; induced resistance.

#### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608  
Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

\**Попова Эльза Викторовна*. Ведущий научный сотрудник,  
кандидат биологических наук, e-mail: elzavpopova@mail.ru

*Коваленко Надежда Михайловна*, Старший научный сотрудник,  
кандидат биологических наук, e-mail: nadyakov@mail.ru

*Тютюрев Станислав Леонидович*. Главный научный сотрудник,  
доктор биологических наук, e-mail: mail@vizr.spb.ru

Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,  
Университетский пр. 26, 198504, Санкт-Петербург, Петродворец,  
Российская Федерация

*Домнина Нина Семеновна*. Доцент, кандидат химических наук,  
e-mail: n.domnina@spbu.ru

Санкт-Петербургский государственный аграрный университет,  
Петербургское шоссе, д. 2, 196601, Санкт-Петербург, Пушкин,  
Российская Федерация

*Колесников Леонид Евгеньевич*. Зав. кафедрой,  
кандидат биологических наук, e-mail: kleon9@yandex.ru

*Борисова Елена Алексеевна*. Магистрант, e-mail: dead-people@mail.ru

\* Ответственный за переписку

#### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608,  
St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

\**Popova Elza Victorovna*. Leading Researcher, PhD in Biology,  
e-mail: elzavpopova@mail.ru

*Kovalenko Nadezhda Mikhailovna*. Senior Researcher, PhD in Biology  
e-mail: nadyakov@mail.ru

*Tyuterev Stanislav Leonidovich*. Principal Researcher, DSc in Biology,  
e-mail: mail@vizr.spb.ru

Institute of chemistry, St. Petersburg state University, University prospect 26,  
198504, Saint-Petersburg, Petrodvoretz, Russian Federation

*Domnina Nina Semenovna*. Dozent, PhD in Chemistry,  
e-mail: n.domnina@spbu.ru

Saint-Petersburg State Agrarian University  
Peterburgskoe shosse, 2, 196601, St. Petersburg, Pushkin,  
Russian Federation

*Kolesnikov Leonid Evgenievich*. Head of Department, PhD in Biology,  
e-mail: kleon9@yandex.ru

*Borisova Elena Alekseevna*. Student of Magistrate,  
e-mail: dead-people@mail.ru

\* Responsible for correspondence